



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑩ Offenlegungsschrift  
DE 196 08 320 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 Q 1/06**  
// (C12Q 1/06, C12R  
1:19)

②1 Aktenzeichen: 196 08 320.6  
②2 Anmeldetag: 22. 2. 96  
④3 Offenlegungstag: 28. 8. 97

DE 196 08 320 A 1

⑦1 Anmelder:  
BiosQuant GmbH, 15344 Strausberg, DE

⑦4 Vertreter:  
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785  
Berlin

⑦2 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Schnellverfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Qualität von Wasser und wasserhaltigen Proben

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Schnellverfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Qualität von Wasser und wasserhaltigen Proben, das die kombinierte Bestimmung der Gesamtkeimzahl und des Gehaltes an Escherichia coli und coliformen Bakterien ohne kulturelle Anzucht beinhaltet. Das Verfahren erlaubt die Bestimmung in maximal einer Stunde und ist so empfindlich und zuverlässig, daß bereits ein E.coli-Keim bzw. ein Keim coliformer Bakterien in 100 ml Wasser sicher nachgewiesen werden kann.

DE 196 08 320 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 97 702 035/513

13/22

Die Erfindung betrifft ein Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung des Mikroorganismengehaltes von Wasser und wasserhaltigen Medien, insbesondere von Trinkwasser. Das Verfahren ist für Betriebskontrollen in der biologischen Abwasserreinigung und Trinkwasseraufbereitung sowie in der Gewässergüteüberwachung anwendbar.

Bei unsachgemäßer Entsorgung kommunaler sowie anderer Abwässer besteht potentiell die Gefahr, daß von Mensch und Tier über den Verdauungstrakt ausgeschiedene mikrobielle Krankheitserreger in das Oberflächen- bzw. Grundwasser gelangen können. Wird dieses Wasser für die Trinkwasserversorgung bzw. zur Lebensmittel- und Getränkeherstellung genutzt, kann es zu gefährlichen Magen- und Darmerkrankungen kommen. Um den Verbraucher vor derartigen Krankheitserregern zu schützen, werden in allen entwickelten Industrieländern regelmäßig bakteriologische Kontrollen des Trinkwassers als auch der damit hergestellten Lebensmittel und Getränke durchgeführt. Um die Sicherheit bei der Produktion von Lebensmitteln und Getränken zu verbessern, wurde von der WHO 1993 ein Programm zur Risikoanalyse an kritischen Kontrollpunkten (HACCP) etabliert, das auf allen Produktionsstufen der Lebensmittel- und Getränkeherstellung Qualitäts- und Hygienekontrollen vorsieht.

Da der Nachweis pathogener Mikroorganismen, wie z. B. Salmonellen oder Shigellen, methodisch relativ arbeits- und zeitaufwendig ist, wird Trinkwasser routinemäßig auf sogenannte Indikatororganismen untersucht, deren Anwesenheit im Wasser auf fäkale Verunreinigungen und damit auch auf ein mögliches Vorkommen krankheitserregender Mikroorganismen hindeutet. Diese Indikatororganismen kommen gewöhnlich unter den gleichen Bedingungen wie die gastrointestinalen Krankheitserreger vor, sind apathogen und methodisch einfacher nachweisbar als die pathogenen Mikroorganismen selbst.

Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen sind *Escherichia coli* (E.coli) und coliforme Bakterien (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*) die als Indikatororganismen am besten geeigneten Mikroorganismen.

Nach der Trinkwasserverordnung der Bundesrepublik Deutschland ist Trinkwasser deshalb grundsätzlich neben der Gesamtkeimzahl auf den Gehalt an E.coli und coliformen Bakterien zu untersuchen, wobei in 100 ml Trinkwasser keine E.coli-Keime und keine Keime von coliformen Bakterien enthalten sein dürfen. Der Richtwert für die Gesamtkeimzahl (Kolonie-bildende Einheit = KBE) beträgt  $10^6$  Keime in 100 ml Trinkwasser.

Es ist von großer Bedeutung, daß die Bestimmungen von E.coli und coliformen Bakterien sowie der Gesamtkeimzahl einen geringen Zeitaufwand erfordern, um insbesondere bei Havarien in der Trinkwasseraufbereitung den Hygienezustand des Wassers schnell beurteilen zu können und so schwerwiegende negative Auswirkungen auf den Gesundheitszustand der Bevölkerung durch schnelles Handeln verhindern zu können. Andererseits müssen die Nachweismethoden zur Bestimmung von E.coli und coliformen Keimen hochempfindlich sein, um mit großer Sicherheit das Vorhandensein eines einzigen solchen Keimes festzustellen.

Die gegenwärtig bekannten und angewendeten Methoden zum Nachweis von E.coli- und coliformen Bakterien basieren auf der Verwendung von fluorogenen

oder chromogenen Enzymsubstraten, die zum Nachweis mikroorganismenspezifischer Enzyme dienen.

Das Prinzip dieser Anwendung beruht darauf, daß die eingesetzten Enzymsubstrate, die keine Eigenfluoreszenz und Autohydrolyse aufweisen dürfen, durch die Mikroorganismen aufgenommen und durch die mikroorganismenspezifischen Enzyme hydrolysiert werden, wodurch zwei Spaltprodukte entstehen. Ein Spaltprodukt besitzt ein höheres Absorptions- bzw. Emissionsmaximum als das Enzymsubstrat selbst und läßt so den Mikroorganismus schließlich gefärbt bzw. unter UV-Belichtung fluoreszierend erscheinen (vgl. M. Manafi, Ernährung/NUTRITION, Vol. 15, Nr. 10, 1991, S. 581—586).

So findet zur Identifikation von coliformen Bakterien, die das charakteristische Enzym  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -GAL) besitzen, häufig als chromogenes Enzymsubstrat 5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-GAL) Anwendung, aus dem durch die  $\beta$ -Galactosidase das blau gefärbte 5-Bromo-4-chloro-3-Indol freigesetzt wird. Weitere anwendbare Enzymsubstrate zum Nachweis coliformer Bakterien werden von M. Manafi in Ernährung/NUTRITION, Vol. 15, Nr. 10, 1991, S. 582 beschrieben.

Die zum Nachweis von E.coli anwendbaren Enzymsubstrate sind ebenfalls in dieser Literaturstelle (S. 582) beschrieben. So wurde bereits das fluorogene 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) vielfach mit Erfolg eingesetzt. Dieses farblose Enzymsubstrat wird durch das für E.coli charakteristische Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase ( $\beta$ -GUD) zu Glucuronsäure und 4-Methylumbelliferon (4-MU) gespalten. Durch Anregung mit UV-Licht (360—365 nm) wird 4-MU zur Fluoreszenz angeregt, die auf das Vorhandensein von E.coli hinweist.

Eine positive, wenn auch geringere  $\beta$ -D-Glucuronidase Aktivität wurde allerdings auch bei einzelnen Stämmen anderer Mikroorganismen (z. B. *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*) festgestellt. Aus diesem Grunde wird zur eindeutigen Bestätigung der E.coli-Anwesenheit noch der Indoltest durchgeführt. E.coli ist das einzige gramnegative Stäbchen-Bakterium in der Familie der Enterobacteriaceen, welches auch eine positive Indol-Reaktion aufweist. Sie beruht auf der Wirkung des Enzyms Tryptophanase und zeigt sich in einer Rotfärbung des Mediums, wenn man diesem das sog. Kovacs-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd 5 g, Amylalkohol 75 ml, konz. HCL 25 ml) zusetzt (R. Süßmuth et al., Biochem.mikrobiol. Praktikum, G. Thieme Verlag Stuttgart, New York 1987, S. 68). Bei den üblichen Testverfahren werden zum Indol-Nachweis mindestens 5 Kolonien von Agarmedium nach 20-stündiger Bebrütung gebraucht. Die Indol-Bildung selbst kann beim Vorliegen von mindestens  $10^5$  Keimen pro 100 ml in ca. 10 Minuten durchgeführt werden.

Nachteilig an den beschriebenen mikrobiologischen Methoden zum Nachweis der coliformen Bakterien und E.coli sind die langen, bei der kulturellen Anzucht in Flüssig- und Agarmedien notwendigen Inkubationszeiten zwischen 24—48 Stunden, die insbesondere bei Havarien in der Trinkwasserversorgung ein schnelles Handeln unmöglich machen.

Auch Methoden zum Simultannachweis von coliformen Bakterien und E.coli in flüssigen oder festen Nährmedien erfordern Bebrütungszeiten von mindestens 7 Stunden bis zu 48 Stunden (M. Manafi et al., Zbl. Hyg., 1989, 189: S. 225—234).

Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, Testverfahren zur Ermittlung des Hygienestatus des Wassers zu

entwickeln, mit denen sich Enzymaktivitäten des bakteriellen Stoffwechsels direkt in Wasserproben ohne kulturelle Anzucht bestimmen lassen.

So beschreiben J.D. Berg und L. Fiksdal in *Applied and Environmental Microbiology*, August 1988, S. 2118—2122 einen Schnellnachweis für coliforme Bakterien im Trinkwasser mittels enzymatischer Hydrolyse von 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid, mit dem sich jedoch erst bei einer Konzentration von 60—100 Keimen pro 100 ml Wasser die Enzymaktivität mittels Fluorimetrie in 15 Minuten quantitativ erfassen läßt. Hinzu kommt die Zeit der Probenvorbereitung von mindestens 30 Minuten. Dieser Test erlaubt also eine relativ schnelle Bestimmung, ist jedoch nicht empfindlich genug. Daneben beschreiben die Autoren eine Membranfiltermethode, bei der die Enzymwirkung über ein im Agarmedium befindliches fluorogenes Substrat sichtbar gemacht wird. Diese Methode erlaubt den Nachweis bereits eines Keimes pro 100 ml Wasser. Mit dieser Methode kann also eine hohe Empfindlichkeit erreicht werden, jedoch dauert der Nachweis mindestens 6 Stunden.

Die gegenwärtigen Grenzen der Bestimmung von coliformen Bakterien und *E.coli* direkt im Wasser ohne kulturelle Anzucht liegen somit in der Nachweisbarkeit der Enzymaktivität, die entweder eine ausreichend große Anzahl von Enzymmolekülen bzw. eine längere Einwirkungsdauer des Enzyms auf das fluorogene oder chromogene Substrat erfordert.

Die bekannten Verfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels fluorogener Substanzen in flüssigen Medien beruhen vorzugsweise auf der Ankopplung fluorogener Substanzen an bestimmte Bestandteile einer Bakterienzelle, wie z. B. DNS, RNS oder Membrankomponenten. In einer laminaren Strömung passieren die fluorchromhaltigen Zellen ein Anregungslicht (Laser) und geben Fluoreszenzimpulse ab, die mit einem Detektor gemessen werden. Die Anzahl der mit einem Durchflußcytometer erfaßten Impulse ist der Konzentration der in der Probe enthaltenen Keime proportional.

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl ist mit diesen Methoden innerhalb von 1-3 Stunden möglich (vgl. M. Manafi, Ernährung/Nutrition, Vol. 15, 1991, S. 586; R.I. Jepras et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Juli 1995, S. 2696—2701).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem der Mikroorganismengehalt von Wasser und wasserhaltigen Proben, insbesondere von Trinkwasser, quantitativ in kürzerer Zeit und mit höherer Genauigkeit bestimmt werden kann. Das Verfahren soll es ermöglichen, in maximal einer Stunde die Gesamtkeimzahl, den *E.coli*-Gehalt und den Gehalt an coliformen Bakterien zuverlässig zu bestimmen, wobei das Verfahren so empfindlich und so zuverlässig sein muß, daß bereits ein *E.coli*-Keim bzw. ein Keim von coliformen Bakterien in 100 ml Wasser sicher nachgewiesen werden kann.

Die Aufgabe der Erfindung wird mit dem Verfahren gemäß Anspruch 1 und den dazugehörigen Unteransprüchen gelöst, wobei die unter a) beschriebene Verfahrensvariante der Bestimmung der Keime auf dem Membranfilter bevorzugt als Einstufenverfahren zur Anwendung kommt, wenn es sich um Wasser mit geringem Keimgehalt, z. B. Trinkwasser, handelt. Dieses Verfahren ist vollautomatisierbar und erlaubt somit die schnelle Abarbeitung großer Meßreihen.

In Proben mit höherem Keimgehalt ist es vorteilhaft, entweder die zweistufige Membranfiltermethode oder

das unter b) beschriebene Durchflußverfahren einzusetzen. Auch die kombinierten Verfahrensvarianten gemäß Anspruch 1c) und 1d) führen zu dem gewünschten Ergebnis.

Neben diesen genannten Verfahrensvarianten erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren auch die separate quantitative Bestimmung des Gehaltes an *E.coli* und coliformen Bakterien, falls dies gewünscht wird (vgl. Beispiele 5 und 6). Dies kann entweder mittels zweistufiger Membranfiltermethode oder zweistufigem Durchflußmeßverfahren erfolgen.

Das erfindungsgemäße Durchflußmeßverfahren kann in einer bevorzugten Ausführungsvariante so durchgeführt werden, daß die die fluorogenen Spaltprodukte enthaltenden Bakterien vom Membranfilter in einem geeigneten Gefäß mit sterilem Wasser abgespült werden und diese Probe im Durchflußcytometer bestimmt wird.

Es hat sich gezeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in maximal einer Stunde neben der Gesamtkeimzahl auch ein einzelner Keim von *E.coli* oder coliformen Bakterien sicher bestimmt werden kann.

So ist es durch den erfindungsgemäßen Einsatz enzymreaktionsfördernder Zusätze möglich, trotz geringer Keimzahlen in relativ kurzer Zeit entsprechend detektierbare Fluoreszenzsignale zu registrieren. Erfindungsgemäß werden als enzymreaktionsverstärkende Zusätze Induktorsubstanzen zur Anregung der Enzymproduktion zugesetzt. Insbesondere kommen hierfür Lactose, Methylthiogalactosid (MTG) oder Isopentenylthiogalactosid (IPTG) in Frage. Weiterhin werden erfindungsgemäß Tenside zur Förderung der Aufnahme von Enzymsubstraten durch die Zellmembran der Bakterien zugesetzt. Hierbei kommen bevorzugt solche Tenside zur Anwendung, die auch gleichzeitig die Aktivitäten nichtcoliformer Bakterien inhibieren, vorzugsweise Nalaurylsulfat. Zur Maskierung eventuell störender Metallionen ist es vorteilhaft, den Komplexbildner EDTA anzuwenden.

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie z. B. Bestimmung des Gehaltes an DNS, ATP oder membrangebundener Fluorchrome, wie sie in R.I. Jepras et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Juli 1995, S. 2696—2701; M.W. LeChevallier et al., *Applied and Environmental Microbiology*, Mai 1993, S. 1526—1531 beschrieben sind.

Als fluorogene  $\beta$ -D-Galactosid und  $\beta$ -D-Glucuronid-Substrate können im erfindungsgemäßen Verfahren alle für *E.coli* und coliforme Bakterien bekannten Substrate eingesetzt werden, vorzugsweise werden als  $\beta$ -D-Galactosid-Substrate  $\beta$ -D-Galactopyranoside, besonders bevorzugt 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, eingesetzt.

Als erfindungsgemäß besonders bevorzugtes  $\beta$ -D-Glucuronid wird 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) eingesetzt.

Die Fluoreszenzanregung der in den Bakterien enthaltenen fluorogenen Spaltprodukte erfolgt mit einer üblichen Lichtquelle, z. B. einem Laser. Bei der erfindungsgemäßen Membranfiltermethode gemäß Anspruch 1a) werden die auf dem Membranfilter befindlichen fluoreszierenden Keime mit einer hochlichtempfindlichen Kamera oder einem Punktdetektor, welcher die Oberfläche Punkt für Punkt abrastert, erfaßt. Das erhaltene Signal wird in üblicher Weise ausgewertet; bevorzugt kann dies durch eine nachgeschaltete Elektronik über eine PC erfolgen.

Bei dem erfindungsgemäßen Durchflußverfahren ent-

sprechend Anspruch 1b wird die Probe durch eine Kapillare gepumpt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt nach Laseranregung der fluorogenhaltigen Zellen mit einem üblichen Durchflußcytometer, wie z. B. in Science, Vol. 204, 1979, S. 403—404 beschrieben. Die Anzahl der mit einem Durchflußcytometer erfaßten Impulse ist der Konzentration der in der Probe enthaltenen Keime proportional.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit und Genauigkeit der Meßgeräte, insbesondere dann, wenn in der Trinkwasserprobe kein E.coli- oder coliformer Keim festgestellt wird, sollten Kontrollmessungen mit einer Probe definierter Konzentration an E.coli und/oder coliformen Bakterien durchgeführt werden. Es ist auch möglich, die Kontrollmessungen mit fluoreszenzierenden Standardproben durchzuführen. Diese Standardproben werden durch Ankopplung fluorogener Moleküle, vorzugsweise solcher aus den spezifischen Enzymsubstraten für E.coli und coliformer Bakterien, wie z. B. 4-Methylumbelliferon, an geeignete Trägerpartikel hergestellt. Die Kontrollmessung kann erfolgen, indem die fluorogene Standardprobe in geeigneter Konzentration in eine keimfreie Wasserprobe gegeben und diese dann über ein Membranfilter abfiltriert wird. Die Anzahl fluorogener Partikel auf dem Filter wird wie beschrieben detektiert.

Nachfolgend soll das erfindungsgemäße Verfahren an Beispielen verdeutlicht werden, ohne es darauf einzuschränken.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer Trinkwasserprobe mittels einstufiger Membranfiltermethode

E.coli u. coliforme Bakterien:

— 100 ml Trinkwasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchm., 0,45 µm Porenweite) filtriert.

— Danach gibt man auf das keimhaltige Membranfilter:

3 ml Nährmedium:

Fleischpepton: 0,43%

Caseinpepton: 0,43%

NaCl: 0,64%

Lactose: 0,35%

Na-laurylsulfat: 0,02%

Phosphatpuffer: pH 7,5

Enzymsubstrate:

0,05 mg/ml 4-Methylumbelliferyl-β-D-Galactopyranosid (4-MU-β-D-Galactopyranosid)

0,05 mg/ml 4-MU-β-D-Glucuronid

— 15 min Inkubation des Ansatzes bei 37°C—41°C zwecks Fluorochrombildung

— Inkubationsansatz abfiltrieren

— Messung fluoreszierender Keime auf dem Membranfilter mittels speziellem Scanner nach Laseranregung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm.

— gegebenenfalls Messung von 100 ml Trinkwasser mit < 5 Partikeln einer fluoreszierenden 4-MU-

Standardprobe zum Vergleich.

Gesamtkeimzahl (DNS-Methode):

- 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2 mit 20 µg/ml Gramicidin S dem keimhaltigen Membranfilter zusetzen
- 2 min einwirken lassen bei Zimmertemperatur
- 5-20 µg intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumjodid, Ethidiumbromid oder Ethidiummonoazid) zusetzen
- 5 min Raumtemperatur
- Fluoreszenzmessung mittels Scanner (Laseranregung bei 488 nm, Detektion bei 550—640 nm).

Es wurden keine E.coli-Keime oder coliforme Bakterien bestimmt. Die Gesamtkeimzahl betrug  $4,6 \cdot 10^1$  Keime/ml.

##### Beispiel 2

Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer leicht verschmutzten Wasserprobe mittels zweistufiger Membranfiltermethode

1. Stufe: Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli und coliformen Bakterien:

— 3 ml Wasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchm., 0,45 µm Porenweite) filtriert. Weiter wird wie im Beispiel 1 verfahren.

2. Stufe: Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels DNS-Methode in einer zweiten Wasserprobe.

Es werden 3 ml Wasser durch ein Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,45 µm Porenweite) filtriert und weiter wie in Beispiel 1 verfahren.

Es wurden  $6,9 \cdot 10^4$  coliforme Keime inclusive E.coli sowie  $8,3 \cdot 10^5$  Gesamtkeime pro ml gemessen.

##### Beispiel 3

Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer Trinkwasserprobe mittels einstufigen Durchflußverfahrens

E. coli und coliforme Bakterien:

— 100 ml Trinkwasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,45 µm Porenweite) filtriert.

— Membranfilter steril in ein Gefäß mit 5 ml Nährmedium überführen

Nährmedium:

Fleischpepton: 0,43%

Caseinpepton: 0,43%

NaCl: 0,64%

Lactose: 0,35%

Na-laurylsulfat: 0,02%

Phosphatpuffer: pH 7,5

Enzymsubstrate:

0,05 mg/ml 4-MU-(3-D-Galactopyranosid

0,05 mg/ml 4-MU-[3-D-Glucuronid

— 15 min bei 37—41°C schütteln (Fluorochrombildung)

— Membranfilter entnehmen

— Messung fluoreszierender Keime im Nährmedium nach geeigneter Laseranregung im Wellenbereich von 300 nm bis 900 nm im Durchflußcytometer

— gegebenenfalls Messung von 100 ml Trinkwasser mit < 5 Partikeln einer fluoreszierenden 4-MU-Standardprobe nach Durchlaufen o. g. Behandlung zum Vergleich.

#### Gesamtkeimzahl (DNS-Methode):

- 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2 mit 20 µg/ml Gramicidin S zusetzen (Zellabtötung)
- 2 min einwirken lassen bei Zimmertemperatur
- 5–20 µg intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumjodid, Ethidiumbromid oder Ethidiummonoazid) zusetzen
- 5 min Raumtemperatur
- Fluoreszenzmessung im Durchflußcytometer (Laseranregung bei 488 nm, Detektion bei 550–640 nm).

Es wurden keine E. coli-Keime oder coliforme Bakterien nachgewiesen. Die Gesamtkeimzahl betrug  $8,1 \cdot 10^1$  Keime/ml.

#### Beispiel 4

Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer leicht verschmutzten Wasserprobe mittels zweistufigen Membranfilter-/ Durchflußverfahrens

#### 1. Stufe: Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli und coliformen Bakterien.

- 3 ml Wasser werden durch ein Membranfilter gemäß der vorhergehenden Beispiele filtriert. Die weitere Bestimmung erfolgt gemäß Beispiel 1.
- 2. Stufe: Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels ATP-Messung in einer zweiten Wasserprobe
- 1 ml Wasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,45 µm Porenweite) filtriert.
- Zellaufschluß durch Zugabe von

0,5 ml HEPES Puffer pH 7,5  
0,5 ml ATP-Freisetzungsreagenz mit Phosphatasen-inhibitor

- 10 s schütteln und 20 min bei Zimmertemperatur inkubieren
- Filtration
- 150 µl des ATP-haltigen Filtrates in ein Teströhrchen geben
- 100 µl Luciferin-Luciferase-Gemisch zusetzen
- schütteln und 5 s einwirken lassen
- Messung der Chemolumineszenz im Durchflußcytometer
- Berechnung der Keimzahl.

Es wurden  $3,7 \cdot 10^6$  coliforme Keime inclusive E. coli sowie  $9,6 \cdot 10^7$  Gesamtkeime pro ml bestimmt.

#### Beispiel 5

Spezifische Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer leicht verschmutzten Wasserprobe mittels

#### zweistufiger Membranfiltermethode

#### 1. Stufe: Spezifische Bestimmung des Gehaltes an E. coli und coliformen Bakterien

##### E.coli:

- 3 ml Wasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchmesser, 0,45 µm Porenweite) filtriert.
- Danach gibt man auf das keimhaltige Membranfilter:

##### 3 ml Nährmedium:

Fleischpepton: 0,43%  
Caseinpepton: 0,43%  
NaCl: 0,64%  
Na-laurylsulfat: 0,02%  
Phosphatpuffer: pH 7,5  
Enzymsubstrat:  
0,05 mg/ml 4-MU-β-D-Glucuronid

- 15 min Inkubation des Ansatzes bei 41°C (Fluorochrombildung)
- Inkubationsansatz abfiltrieren
- Messung fluoreszierender Keime auf dem Membranfilter mittels speziellem Scanner bei > 465 nm nach Laseranregung bei > 365 nm

#### Coliforme Bakterien:

- Danach gibt man auf das keimhaltige Membranfilter:

##### 3 ml Nährmedium:

Fleischpepton: 0,43%  
Caseinpepton: 0,43%  
NaCl: 0,64%  
Lactose: 0,35%  
Na-laurylsulfat: 0,02%  
Phosphatpuffer: pH 7,5  
Enzymsubstrat:  
0,05 mg/ml 4-MU-β-D-Galactopyranosid

- 15 min Inkubation des Ansatzes bei 37°C (Fluorochrombildung)
- Inkubationsansatz abfiltrieren
- Messung fluoreszierender Keime auf dem Membranfilter mittels speziellem Scanner nach Laseranregung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm.

#### 2. Stufe: Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels DNS-Methode in einer zweiten Wasserprobe: Durchführung gemäß Beispiel 2.

Es wurden  $4,5 \cdot 10^2$  E. coli-Keime,  $5,7 \cdot 10^4$  coliforme Bakterien pro ml bestimmt. Die Gesamtkeimzahl betrug  $9,6 \cdot 10^8$  Keime/ml.

#### Beispiel 6

Spezifische Bestimmung des Gehaltes an Escherichia coli, coliformen Bakterien und der Gesamtkeimzahl in einer leicht verschmutzten Wasserprobe mittels zweistufigen Durchflußverfahrens

#### 1. Stufe: Spezifische Bestimmung des Gehaltes an E. coli und coliformen Bakterien

##### E. coli:

- 3 ml Wasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchm., 0,45 µm Porenweite) filtriert.
- Membranfilter steril in ein Gefäß mit 5 ml Nährmedium überführen

3 ml Nährmedium:

Fleischpepton: 0,43%

Caseinpepton: 0,43%

NaCl: 0,64%

Na-laurylsulfat: 0,02%

Phosphatpuffer: pH 7,5

Enzymsubstrate:

0,05 mg/ml 4-MU-β-D-Glucuronid

- 15 min bei 41°C schütteln (Fluorochrombildung)
- Membranfilter entnehmen
- Messung fluoreszierender Keime im Nährmedium nach Laseranregung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm im Durchflußcytometer

#### Coliforme Bakterien:

- Danach zum Nährmedium zugeben:

Lactose 0,35%

Enzymsubstrat 0,05 mg/ml 4-MU-β-D-Galactopyranosid

- 15 min bei 37°C schütteln (Fluorochrombildung)
- Messung fluoreszierender Keime im Nährmedium nach Laseranregung im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 900 nm im Durchflußcytometer.

2. Stufe: Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels DNS-Methode in einer zweiten Wasserprobe:

- 3 ml Wasser werden durch ein Membranfilter (25 mm Durchm., 0,45 µm Porenweite) filtriert.
- Danach gibt man das keimhaltige Membranfilter in ein Gefäß mit 5 ml Phosphatpuffer pH 7,2 und 20 µg/ml Gramicidin S (zur Zellabtötung)
- 2 min schütteln bei Zimmertemperatur
- Membranfilter entnehmen
- 5–20 µg intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumjodid, Ethidiumbromid oder Ethidiummonoazid) zusetzen
- 5 min Raumtemperatur
- Fluoreszenzmessung im Durchflußcytometer nach geeigneter Laseranregung bei 300 nm–900 nm.

Es wurden  $7,4 \cdot 10^3$  E. coli-Keime,  $1,7 \cdot 10^4$  coliforme Bakterien pro ml bestimmt. Die Gesamtkeimzahl betrug  $8,1 \cdot 10^8$  Keime/ml.

#### Patentansprüche

1. Schnellverfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Qualität von Wasser und wasserhaltigen Proben, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren die kombinierte Bestimmung der Gesamtkeimzahl und des Gehaltes an Escherichia coli und coliformen Bakterien ohne kulturelle Anzucht beinhaltet, indem

a) aus der zu untersuchenden Wasserprobe die Bakterien über ein Membranfilter abgetrennt werden, zunächst zur Bestimmung des Gehaltes an E.coli und coliformen Bakterien auf das Membranfilter ein Nährmedium mit fluorogenen β-D-Galactosid- und β-D-Glucuronid-Substraten und mit enzymreaktionsfördernden Zusätzen gegeben wird, nach Inkubation

die fluorogenen Spaltprodukte auf der Membranfilteroberfläche mittels lichtinduzierter Fluoreszenzmessung erfaßt werden, anschließend alle Bakterien abgetötet werden und mittels an sich üblicher Methoden die Gesamtkeimzahl auf dem Membranfilter durch Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Messung bestimmt wird oder

b) aus der zu untersuchenden Wasserprobe die Bakterien über ein Membranfilter abgetrennt werden, die Bakterien zur Bestimmung des Gehaltes an E.coli und coliformen Bakterien mit Nährmedium in Kontakt gebracht werden, das fluorogene β-D-Galactosid- und β-D-Glucuronid-Substrate und enzymreaktionsfördernde Zusätze enthält, nach Inkubation die fluorogenen Spaltprodukte durch lichtinduzierte Fluoreszenzmessung im Durchflußcytometer detektiert werden, anschließend alle Bakterien abgetötet werden und die Gesamtkeimzahl mittels an sich üblicher Methoden durch lichtinduzierte Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzmessung im Durchflußcytometer bestimmt wird, oder

c) in der zu untersuchenden Wasserprobe zunächst der Gehalt an E.coli und coliformen Bakterien auf dem Membranfilter gemäß Variante a) bestimmt wird und in einer zweiten Wasserprobe die Gesamtkeimzahl im Durchflußcytometer gemäß Variante b) bestimmt wird oder

d) in der zu untersuchenden Wasserprobe zunächst der Gehalt an E.coli und coliformen Bakterien im Durchflußcytometer gemäß Variante b) bestimmt wird und anschließend in der gleichen Probe die Gesamtkeimzahl auf dem Membranfilter gemäß Variante a) bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranfiltermethode gemäß Anspruch 1a) oder die Durchflußmethode gemäß Anspruch 1b) Einstufenverfahren sind, mit denen die Gesamtkeimzahl aus der gleichen Wasserprobe und auf dem gleichen Membranfilter bzw. im gleichen Inkubationsansatz bestimmt wird wie der Gehalt an E.coli- und coliformen Bakterien.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranfiltermethode gemäß Anspruch 1a) oder die Durchflußmethode gemäß Anspruch 1b) Zweistufenverfahren sind, mit denen die Gesamtkeimzahl aus einer zweiten Wasserprobe und auf einem anderen Membranfilter bzw. einem anderen Inkubationsansatz bestimmt wird als der Gehalt an E.coli- u. coliformen Bakterien.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als fluorogene β-D-Galactosid-Substrate β-D-Galactopyranoside eingesetzt werden, vorzugsweise 3-Methylumbelliferyl-β-D-Galactopyranosid.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als fluorogenes β-D-Glucuronid-Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid eingesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymreaktionsfördernde Zusätze Induktorsubstanzen zur Anregung der Enzymproduktion zugesetzt werden, vorzugsweise Lactose, Methylthiogalactosid oder Iso-

pentenylthiogalactosid.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymreaktionsfördernde Zusätze reaktionsbeschleunigende Zusätze zugesetzt werden, vorzugsweise Tenside. 5

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl das Abtöten der Bakterien mittels Antibiotika erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, 10  
dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren zur Bestimmung von E.coli und coliformen Bakterien als Kontrollverfahren durchgeführt wird, indem entweder eine Probe definierter Konzentration an E.coli und/oder coliformen Bakterien eingesetzt 15  
wird oder an Träger immobilisierte fluorogene Spaltprodukte, die aus den entsprechenden Enzymsubstraten freigesetzt werden, als Standardproben etabliert werden.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -